リアルタイム PCR（Probe 法）実験ガイド

この文書では、Probe 法によるリアルタイム PCR について、蛍光検出の原理や実験操作の流れなどを解説します。実際の実験操作の詳細については、各製品の取扱説明書をご参照ください。

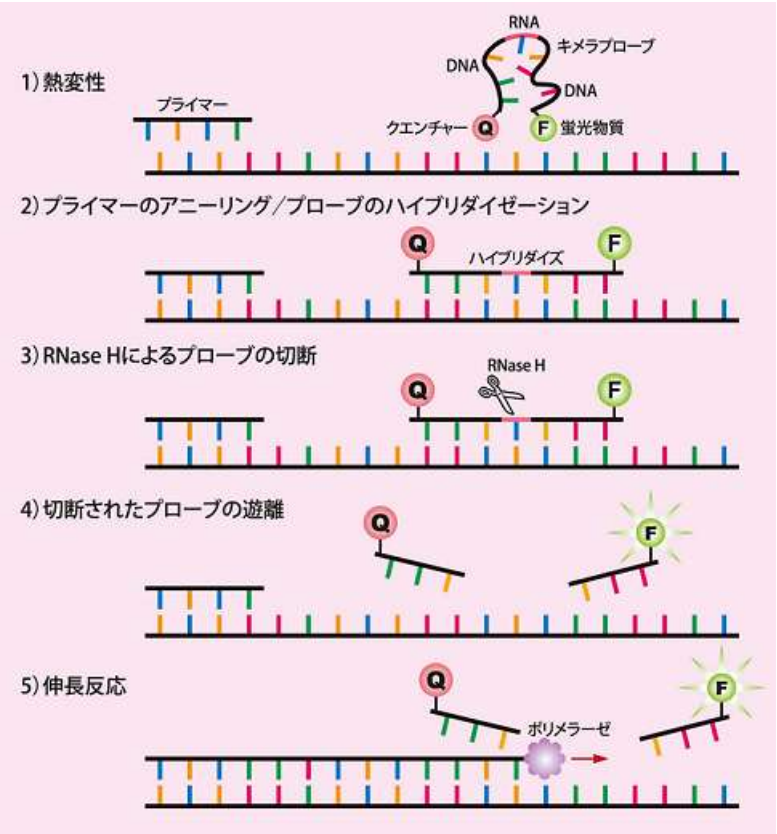
－目次－

1　蛍光検出の原理
2　実験に必要なもの
3　実験操作法
4　結果の解析

1　蛍光検出の原理

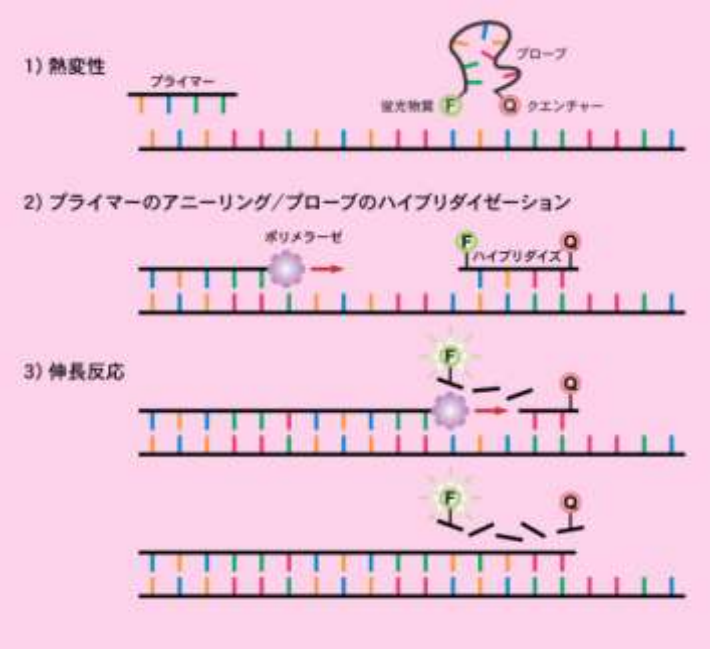
サイクリングプローブによる蛍光検出の原理

サイクリングプローブは、RNA と DNA からなるキメラオリゴヌクレオチドで、片方の末端が蛍光物質で、もう一方の末端がクエンチャー物質で修飾されています。インタクトな状態では蛍光を発しませんが、PCR 増幅産物とハイブリッドを形成すると、反応液中に含まれる RNase H により RNA 部分が切断されて蛍光を発します。サイクリングプローブの RNA 付近にミスマッチが存在すると RNase H による切断は起こらないので、非常に配列特異性の高い検出が可能であり、SNPs タイピングなどに最適です。



TaqMan プローブによる蛍光検出の原理

TaqMan プローブは、5'末端を蛍光物質で、3'末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチドです。このプローブは、アニーリングステップで鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズするように設計されていますが、ハイブリダイズした段階ではプローブ上にクエンチャーが存在するために、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制されています。その後の伸長反応ステップで、Taq DNA ポリメラーゼのもつ 5' → 3'エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型にハイブリダイズした TaqMan プローブが分解されることにより、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光を発するようになります。



2　実験に必要なもの

一般的な実験器具類

マイクロピペット（20, 200, 1000 μl）およびチップ（フィルター付き）
1.5 ml チューブおよびチューブラック
攪拌機（Vortex）
小型遠心機（1.5 ml チューブ用、8 連 0.2 ml チューブ用）など
＊詳細は、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

リアルタイム PCR 装置

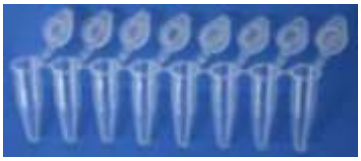
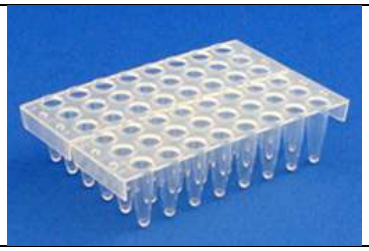
Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズは、日本語仕様の食品環境検査用ソフトウェアを標準搭載しており、遺伝子検査にお勧めの機種です。

器具名称		用途など	
①	Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コードTP700）	48ウェル対応のコンパクトタイプです。	

②	Thermal Cycler Dice Real Time System *II* （製品コードTP900）	96ウェルタイプのスタンダードタイプです。	

リアルタイム PCR 専用消耗品

Thermal Cycler Dice Real Time System をお使いの場合は、専用の消耗品を使用して下さい。遺伝子検査には、チューブ個別にキャップが付いている 8 連チューブがお勧めですが、反応数が多い場合には、96 ウェルプレート等も使用できます。

器具名称		用途など	
①	0.2 mlチューブ: 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps （製品コード NJ600）	独立型フラットキャップ付き8連チューブです。ひとつひとつふたの開閉ができ、コンタミネーション回避に役立ちます。切り離せばシングルチューブとしても利用が可能です。	
②	96ウェルプレート: 96well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）	反応時には、Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）でシールして使用します。	
③	48ウェルプレート: 48 well snap plate（製品コード NJ700）	24 well×2枚に分割可能な48ウェルプレートです。反応時には、Flat cap for snap plate（製品コード NJ720）でキャップをして使用します。	

リアルタイム PCR 試薬

タカラバイオでは、食品検査や環境検査用の遺伝子検査キットを幅広くラインナップしています。

サイクリングプローブ法の試薬

検出対象	製品名
食中毒検査に	
腸管出血性大腸菌	CycleavePCR® O-157（VT gene）Screening Kit Ver.2.0
	CycleavePCR® O-157（VT1/VT2）Typing Kit
サルモネラ	CycleavePCR® *Salmonella* Detection Kit Ver.2.0
腸炎ビブリオ	CycleavePCR® *Vibrio*（*tdh* gene）Detection Kit
セレウス	CycleavePCR® *Bacillus cereus*（CRS gene）Detection Kit
リステリア	CycleavePCR® *Listeria monocytogenes* (*inlA* gene) Detection Kit
カンピロバクター	CycleavePCR® *Campylobacter*（*jejuni*／*coli*）Typing Kit
黄色ブドウ球菌	CycleavePCR® *Staphylococcus aureus*（DnaJ gene）Detection Kit
品種判別に	
肉種判別	CycleavePCR® 肉種判別キット(6種)
水質検査に	
レジオネラ属菌	CycleavePCR® *Legionella*（5S rRNA）Detection Kit Ver.2.0
クリプトスポリジウム	CycleaveRT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit
ジアルジア	CycleaveRT-PCR *Giardia* Ditection (18S rRNA) Detection Kit

TaqMan プローブ法の試薬

食中毒検査に	
ノロウイルス	TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit

3　実験操作法

(1) サンプルの調製（エリア 2 で実施）

検体の種類や実験目的に適した方法でサンプルの調製を行います。簡易的な抽出を行う方法としては、熱抽出法やアルカリ熱抽出法があります。高純度な DNA が必要な場合は、DNA 精製キットを使用して調製します。

＊ DNA 調製法に関しては、別冊の「DNA/RNA 調製法 実験ガイド」をご参照ください。

＊ 実験エリアに関しては、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

＊ クリプトスポリジウムやノロウイルス等、RNA を検出対象とする製品の核酸調製方法に関しては、各製品の取扱説明書をご参照ください。

(2) リアルタイム PCR 用装置のセッティング（エリア 2 で実施）

＊ Thermal Cycler Dice Real Time シリーズを使用する場合は、別冊の「Thermal Cycler Dice Real Time Quick Manual」をご参照ください。

(3) 反応液の調製（エリア 1→3 で実施）

＊ 操作方法の詳細は、各製品の取扱説明書をご参照ください。

① 反応液の調製（エリア 1 で実施）

サンプル以外の試薬のマスターミックスを氷上で調製し、リアルタイム PCR 専用チューブに分注し、キャップを軽く閉めます。

12 反応分のマスターミックス調製例

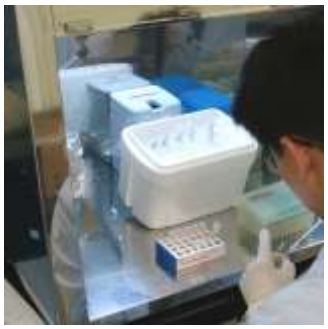
試薬	1 反応当り	12 反応分
2× CycleavePCR Master Mix	12.5 μl	150 μl
5× Primer/Probe mix	5 μl	60 μl
dH_2O	2.5 μl	30 μl

② 陰性コントロールの添加（エリア 1 で実施）

陰性コントロールのチューブに dH_2O を 5 μl 添加し、チューブのキャップをしっかり閉めます。

③ サンプルおよび陽性コントロールの添加（エリア 3 で実施）

エリア 3 に移動し、(1)で調製したサンプルおよび陽性コントロールを各 5 μl 添加し、チューブのキャップをしっかり閉めます。



リアルタイム PCR 反応液は、コンタミネーション防止のため、クリーンベンチ内で調製します。試薬は、酵素の失活を避けるため、アイスボックス内で氷上で取り扱ってください。

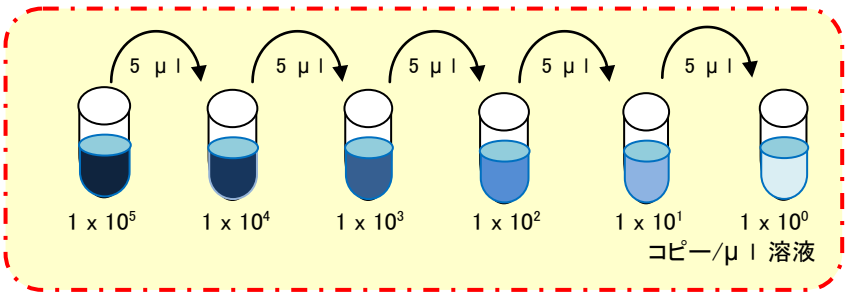
(4) リアルタイム PCR の開始（エリア 2 で実施）

リアルタイム PCR 反応液が入ったチューブを軽くスピンダウンし、リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始します。

補足：検量線作成用のスタンダードサンプルの調製

定量解析が可能なキットには、検量線作成用に陽性コントロール（Positive Control Plasmid）および段階希釈用の EASY Dilution が添付されています。段階希釈は、以下のような要領で行います。

1. 1 × 10^5 copies/μl （Positive Control 原液）
2. 1 × 10^4 copies/μl （ Positive Control 原液 5μl ＋ EASY Dilution 45μl）
3. 1 × 10^3 copies/μl （2. の1×10^4 copies/μl 溶液 5μl ＋ EASY Dilution 45μl）
4. 1×10^2 copies/μl （3. の1×10^3 copies/μl 溶液 5μl ＋ EASY Dilution 45μl）
5. 10 copies/μl （4. の1×10^2 copies/μl 溶液 5μl ＋ EASY Dilution 45μl）
6. 1 copy/μl （5. の 10 copies/μl 溶液 5μl ＋ EASY Dilution 45μl）



4 結果の解析

増幅曲線と Ct 値

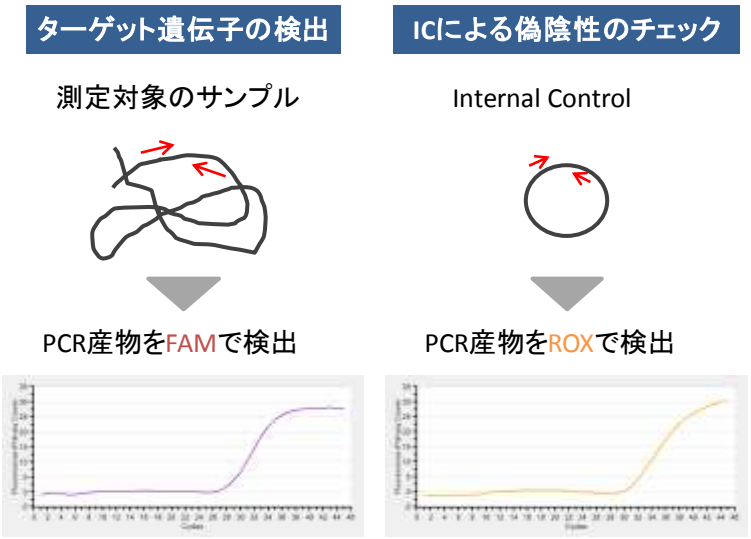
PCR 増幅の有無は、増幅曲線で確認します。

コントロール反応の結果が適切であることを確認した上で、測定対象サンプルの増幅の有無を判定します。増幅が認められた場合には、陽性と判定されます。増幅が認められない場合には、陰性と推定されますが、PCR 阻害物質による偽陰性の可能性がありますので、後述のインターナルコントロールの結果と合わせて判定します。

増幅曲線が閾値に達した時のサイクル数を Ct 値と呼び、Ct 値は初期鋳型量の目安となります。Ct 値が小さい場合は鋳型量が多く、Ct 値が大きい場合は鋳型量が少なかったと推測されます。

インターナルコントロールによる PCR 阻害の有無の確認

試薬にインターナルコントロールが添加されているキットでは、PCR 阻害の有無を確認することができます。インターナルコントロールの増幅が認められた場合には、PCR 阻害はなかったと判断されます。ターゲット、インターナルコントロールともに増幅が認められなかった場合には、偽陰性の疑いがあります。



陽性コントロールによる定量解析

定量解析が可能なキットでは、キットに添付されている陽性コントロール（Positive Control Plasmid）を段階希釈したものを用いて検量線を作成し、測定対象サンプルの定量を行うことができます。リアルタイム PCR の結果として算出される定量値は、Positive Control Plasmid のコピー数相当量なので、実際の菌数として表すには、その検出系に適した方法で換算する必要があります。

例えば、レジオネラ属菌の検出キット（製品コード CY210）では、Positive Control Plasmid および既知数のレジオネラ属菌を用いて検量線を作成し、その切片の差から Positive Control Plasmid 17 コピー＝1 cfu という換算値が求められています。詳しくは、各製品の取扱説明書をご参照ください。